

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office.  
Office européen des brevets



(11)

EP 1 103 611 A1

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
30.05.2001 Patentblatt 2001/22

(51) Int Cl.7: C12N 15/52, C12N 9/00,  
C12P 13/04, C12P 13/14  
// (C12P13/04, C12R1:15)

(21) Anmeldenummer: 00125527.2

(22) Anmeldetag: 22.11.2000

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE TR  
Benannte Erstreckungsstaaten:  
AL LT LV MK RO SI

(72) Erfinder:  
• Möckel, Bettina, Dr.  
40597 Düsseldorf (DE)  
• Pfefferle, Walter, Dr.  
33790 Halle (Westf.) (DE)  
• Marx, Achim, Dr.  
33613 Bielefeld (DE)

(30) Priorität: 25.11.1999 DE 19956686

(71) Anmelder: Degussa AG  
40474 Düsseldorf (DE)

(54) Für die Gene sucC und sucD kodierende Nukleotidsequenzen

(57) Die Erfindung betrifft für die Gene sucC und sucD kodierende Polynukleotide, die Polynukleotidsequenzen enthalten, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 enthält,

c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

d) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das

eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3,

e) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b), c) oder d), und

e) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), c), d) oder e),

ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen die Gene abgeschwächt vorliegen und die Verwendung der Polynukleotidsequenzen als Hybridisierungssonden.

EP 1 103 611 A1

## Beschreibung

[0001] Gegenstand der Erfindung sind für die Gene *sucC* und *sucD* kodierenden Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Glutamat, unter Verwendung von Bakterien, in denen das *sucC*- und/oder *sucD*-Gen abgeschwächt wird.

## Stand der Technik

[0002] L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Glutamat, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

[0003] Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation oder die Aufarbeitung zur Produktform durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

[0004] Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

[0005] Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt.

## Aufgabe der Erfindung

[0006] Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Glutamat, bereitzustellen.

## Beschreibung der Erfindung

[0007] Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt sind L-Lysin und L-Glutamat.

[0008] Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 enthält,

c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

d) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3,

e) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b), c) oder d), und

f) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b), c), d) oder e),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Succinyl-CoA Synthetase aufweist.

[0009] Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

**[0010]** Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 4, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist,

ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das sucC- und/oder sucD-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

**[0011]** Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige sucC- und/oder sucD-Gen mit der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthalten mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

**[0012]** Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA, um cDNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für Succinyl-CoA Synthetase kodieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der der Succinyl-CoA Synthetase Gene aufweisen.

**[0013]** Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für Succinyl-CoA Synthetase kodieren.

**[0014]** Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

**[0015]** "Isoliert" bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

**[0016]** "Polynukleotid" bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

**[0017]** Unter "Polypeptiden" versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

**[0018]** Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen die Polypeptide gemäß SEQ ID No. 2 und SEQ ID No. 3, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Succinyl-CoA Synthetase und auch solche ein, die zu wenigstens 70% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 oder SEQ ID No. 3, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90 % bis 95 % Identität mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 oder SEQ ID No. 3 und die genannte Aktivität aufweisen.

**[0019]** Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, insbesondere L-Lysin und L-Glutamat, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits die Aminosäuren insbesondere L-Lysin und/oder L-Glutamat produzieren und in denen die für das sucC- und/oder sucD-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

**[0020]** Der Begriff "Abschwächung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

**[0021]** Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere

L-Lysin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

5 [0022] Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind besonders die bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
 10 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
*Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
 15 *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme, wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

20 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 1709  
*Brevibacterium flavum* FERM-P 1708  
*Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1712  
*Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6463  
*Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6464 und  
 25 *Corynebacterium glutamicum* DSM 5714.

[0023] Die neuen, für das Enzym Succinyl-CoA Synthetase (EC 6.2.1.5) kodierenden Gene *sucC* und *sucD* von *C. glutamicum* wurden isoliert.

30 [0024] Zur Isolierung des *sucC*- und/oder des *sucD*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

40 [0025] Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHc79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). O'Donohue (The Cloning and Molecular Analysis of Four Common Aromatic Amino Acid Biosynthetic Genes from *Corynebacterium glutamicum*. Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Galway, 1997) beschreibt die Klonierung von *C. glutamicum* Genen unter Verwendung des von Short et al. (Nucleic Acids Research, 16: 7583) beschriebenen  $\lambda$  Zap Expressionssystems.

45 [0026] Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5a (Jeffrey H. Miller: "A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria", Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).

50 [0027] Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen  $\lambda$ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

[0028] Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben.

55 [0029] Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) dem FASTA-Algorithmus von Pearson und Lipman (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85,2444-2448 (1988)) oder dem BLAST-Algorithmus von Altschul et al. (Nature Genetics 6, 119-129 (1994)) untersucht und mit den in öffentlich zugänglichen Datenbanken vorhandenen Sequenz-



einträgen verglichen werden. Öffentlich zugängliche Datenbanken für Nukleotidsequenzen sind beispielsweise die der European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland) oder die des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

[0030] Die neuen für das sucC- und sucD-Gen kodierende DNA-Sequenzen von *C. glutamicum* wurden gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus den vorliegenden DNA-Sequenzen mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteine abgeleitet. In SEQ ID No. 2 und SEQ ID No. 3 sind die sich ergebenden Aminosäuresequenzen des sucC- und des sucD Genproduktes dargestellt.

[0031] Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben.

[0032] Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

[0033] Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

[0034] Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

[0035] Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des sucC- und/oder sucD-Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, produzieren.

[0036] Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des suc- und/oder sucD-Gens oder die katalytischen Eigenschaften der Enzymproteine herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

[0037] Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z. B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Patek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers ("Molekulare Genetik", 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

[0038] Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel ("Die Threonindehydratase aus *Corynebacterium glutamicum*: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms", Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem von Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

[0039] Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen ("missense mutations") oder Nichtsinnmutationen ("nonsense mutations") gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen ("frame shift mutations"), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers ("Molekulare Genetik", 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

[0040] Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung ("gene disruption") und des Gen-Austauschs ("gene replacement").

[0041] Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt.

[0042] Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des *recA*-Gens von *C. glutamicum* verwendet. Das *sucC*- und/oder *sucD*-Gen können auf diese Weise ausgeschaltet werden.

[0043] Bei der Methode des Genaustausches ("gene replacement") wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Excision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das *pyc*-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten. In das *sucC*- und/oder *sucD*-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

[0044] In das *sucC*- und/oder *sucD* -Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

[0045] Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des *sucC*- und/oder *sucD*-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren.

[0046] So kann für die Herstellung von L-Lysin und/oder L-Glutamat neben der Abschwächung des *sucC*- und/oder *sucD*-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende *dapA*-Gen (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende *gap*-Gen (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen *tpi* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen *pgk* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086),

- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende pyc-Gen(Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
- das für den L-Lysin-Export kodierende lysE-Gen (DE-A-195 48 222),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1 (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

[0047] Weiterhin kann es für die Produktion von L-Lysin und/oder - L-Glutamat vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des sucC- und/oder sucD -Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113)
- abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

[0048] Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und/oder L-Glutamat, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des sucC- und/oder sucD-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

[0049] Die das Polynukleotid gemäß Anspruch 1 enthaltenden Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0050] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

[0051] Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

[0052] Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff- haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

[0053] Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0054] Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt



werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0055] Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch "reversed phase" HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

[0056] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

### Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

[0057] Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

### Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung der Gene *sucC* und *sucD*

[0058] Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den *E. coli* Stamm DH5αMCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 µg/ml Zeocin ausplattiert. Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067).



Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

[0059] Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

[0060] Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1206 Basenpaaren, welches als sucC-Gen bezeichnet wurde, sowie ein offenes Leseraster von 882 Basenpaaren, welches als sucD bezeichnet wurde. Das sucC-Gen kodiert für ein Polypeptid von 402 Aminosäuren, welches in SEQ ID No. 2 dargestellt ist. Das sucD-Gen kodiert für ein Polypeptid von 294 Aminosäuren, welches in SEQ ID No. 3 dargestellt ist.

### Beispiel 3

#### 3.1 Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des sucC-Gens

[0061] Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des sucC-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt:

sucC-in1:

5'CGC GCG AAT CGT TCG TAT 3'

sucC-in2:

5'CGC CAC CAA TGT CTA GGA 3'

[0062] Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press) mit der Pwo-Polymerase der Firma Boehringer Mannheim (Deutschland, Produktbeschreibung Pwo DNA Polymerase, Product No. 1 644 947) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer die Amplifikation eines ca. 0,55 kb großen internen Fragmentes des sucC-Gens. Das so amplifizierte Produkt wurde in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft.

[0063] Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem Zero Blunt™ Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K2700-20) in den Vektor pCR®Blunt II (Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) ligiert.

[0064] Anschließend wurde der *E. coli* Stamm TOP10 mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA Cloning. A Practical Approach, Vol. I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) elektroporiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCRBluntsucCint genannt und ist in Figur 1 dargestellt.

#### 3.2 Deletion des sucD-Gen

[0065] Hierzu wurde aus dem Stamm ATCC13032 nach der Methode von Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum* bekannten Sequenz des sucD-Gens wurden die im folgenden beschriebenen Oligonukleotide für die Erzeugung des sucD Deletionsallels ausgewählt.

sucD-d1:

5'-CGA TGT GAT TGC GCT TGA TG -3'

sucD-d2:

5'-ACC TCA CGC ATA AGC TTC GCA TGC TCT GAA CCT TCC GAA C -  
3'

sucD-d3:

5'-GTT CGG AAG GTT CAG AGC ATG CGA AGC TTA TGC GTG AGG T -  
3'

sucD-d4:

5'-ATG AAG CCA GCG ACT GCA GA -3'

[0066] Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und die PCR-Reaktion unter Verwendung der Pfu-Polymerase (Stratagene, Product. No. 600135, La Jolla, USA) und des PTC 100-Thermocyclers (MJ Research Inc., Waltham, USA) durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer die Amplifikation eines sucD Allels mit interner Deletion. Das so amplifizierte Produkt wurde in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft und ebenso wie bei Sanger et al. beschrieben (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) sequenziert.

#### Beispiel 4

##### 4.1 Integrationsmutagenese des sucC-Gens in dem Stamm DSM 5715

[0067] Der in Beispiel 3.1 genannte Vektor pCRBluntsucCint wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et.al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in *C. glutamicum* DSM 5715 (EP 0 435 132) elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten L-Lysin-Produzenten. Der Vektor pCRBluntsucCint kann in DSM5715 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCRBluntsucCint erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

[0068] Für den Nachweis der Integration wurde das sucCint-Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert. Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen SphI und HindIII geschnitten. Die entstehenden Fragmente wurden mittels der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3.1 genannte Plasmid pCRBluntsucCint hatte innerhalb des chromosomalen sucC-Gens ins Chromosom von DSM5715 inseriert. Der Stamm wurde als DSM5715::pCRBluntsucCint bezeichnet.

##### 4.2 Konstruktion des Austauschvektors pK18mobsacBsucDdel

[0069] Das in Beispiel 3.2 erhaltene sucD-Deletionsderivat wurde nach Auftrennung in einem Agarosegel (0,8%) mit Hilfe des Qiagenquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) aus dem Agarosegel isoliert und mit dem mobilisierbaren Klonierungsvektor pK18mobsacB (Schäfer et al. (1994), Gene 14: 69-73) zur Ligation eingesetzt. Dieser wurde zuvor mit dem Restriktionsenzymen XmaI- und XbaI aufgespalten, mit dem sucD- Deletionsallel gemischt und mit T4-DNA-Ligase (Amersham- Pharmacia, Freiburg, Germany) behandelt.

[0070] Anschließend wurde der E.coli Stamm DHSomcr (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In. DNA Cloning. A Practical Approach, Vol.1, IRL-Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989) elektroporiert. Die Selektion der Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup>

Ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

[0071] Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und das klonierte sucD-Deletionsallel mittels Sequenzierung durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) verifiziert. Das Plasmid wurde pK18mobsacBsucDdel genannt. Der Stamm wurde als E.coliDH5 $\alpha$ mcrr/pK18mobsacBsucDdel bezeichnet.

#### 4.3 Deletionsmutagenese des sucD-Gens in dem C. glutamicum Stamm DSM 5715

[0072] Der in Beispiel 4.2 genannte Vektor pK18mobsacBsucDdel wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et al., (1989 FEMS Microbiology Letters 123: 343-347) elektroporiert. Der Vektor kann in DSM 5715 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom integriert hat. Die Selektion von Klonen mit integriertem pK18mobsacBsucDdel erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB-Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed., Cold Spring Harbor, New York, 1989), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Angewachsene Klone wurden auf LB-Agarplatten mit 25 mg/l Kanamycin ausgestrichen und für 16 Stunden bei 33°C inkubiert.

[0073] Um die Excision des Plasmides zusammen mit der vollständigen chromosomalen Kopie des sucD-Gens zu erreichen, wurden die Klone anschließend auf LB-Agar mit 10% Sucrose angezogen. Das Plasmid pK18mobsacB enthält eine Kopie des sacB-Gens, welches Sucrose in die für C. glutamicum toxische Levansucrase umwandelt. Auf LB-Agar mit Sucrose wachsen daher nur solche Klone an, bei denen das integrierte pK18mobsacBsucDdel wiederum excidiert hat. Bei der Excision kann zusammen mit dem Plasmid entweder die vollständige chromosomale Kopie des sucD-Gens excidieren, oder die unvollständige Kopie mit der internen Deletion.

[0074] Um nachzuweisen, daß die unvollständige Kopie von sucD im Chromosom verblieben ist, wurde das Plasmid pK18mobsacBsucDdel Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert. Chromosomale DNA einer potentiellen Deletionsmutante wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)) isoliert und jeweils mit dem Restriktionsenzymen SphI und PstI in getrennten Ansätzen geschnitten. Die entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Anhand der entstandenen Fragmente konnte gezeigt werden, daß der Stamm DSM5715 seine vollständige Kopie des sucD-Gens verloren hat und stattdessen nur noch über die deletierte Kopie verfügt.

Der Stamm wurde als C. glutamicum DSM5715 $\Delta$ sucD bezeichnet.

#### Beispiel 5

##### 5.1 Herstellung von L-Glutamat mit dem Stamm DSM 5715::pCRBluntsucCint

[0075] Der in Beispiel 4.1 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM5715::pCRBluntsucCint wurde in einem zur Produktion von L-Glutamat geeigneten Nährmedium kultiviert und der Glutamatgehalt im Kulturüberstand bestimmt.

[0076] Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Him-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium Cg III verwendet.

Medium Cg III	
NaCl	2,5 g/l
Bacto-Pepton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	10 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	2% (w/v)
Der pH-Wert wurde auf pH 7.4 eingestellt	

[0077] Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet

Medium MM	
CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l



(fortgesetzt)

Medium MM	
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50g/l
Salze:	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	5,0 mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
Fumarat (sterilfiltriert)	5,81 g/l
Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO <sub>3</sub>	25 g/l

[0078] CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO<sub>3</sub> zugesetzt.

[0079] Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

[0080] Nach 24 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Glutamatmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

[0081] In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	L-Glutamat mg/l
DSM5715	10,4	20
DSM5715::pCRBlunt sucCint	3,9	154

## 5.2 Herstellung von L-Glutamat mit dem Stamm DSM5715 $\Delta$ sucD

[0082] Der in Beispiel 4.3 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM5715/pK18mobsacBsucDdel wurde in einem zur Produktion von L-Glutamat geeigneten Nährmedium kultiviert und der Glutamatgehalt im Kulturüberstand bestimmt.

[0083] Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet. Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

[0084] Die Kultivierung erfolgte in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

[0085] Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Glutamatmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

[0086] In Tabelle 2 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 2

Stamm	OD (660 nm)	L-Glutamat mg/l
DSM5715	8,1	7
DSM5715 $\Delta$ sucD	13,3	33

Folgende Figuren sind beigefügt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCRBluntsucCint.

[0087] Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

KmR: Kanamycin Resistenz-Gen  
 Zeocin: Zeocin Resistenz-Gen  
 HindIII: Schnittstelle des Restriktionsenzym HindIII  
 SphI: Schnittstelle des Restriktionsenzym SphI  
 EcoRI: Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI  
 sucCint: internes Fragment des sucC-Gens  
 ColE1 ori: Replikationsursprung des Plasmides ColE1

Figur 2: Karte des Plasmids pK18mobsacBsucDdel

[0088] Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

oriV: ColE1-ähnlicher Origin aus pMB1  
 sacB: das für das Protein Levansucrose kodierende sacB-Gen  
 RP4mob: RP4-Mobilisierungs-Site  
 Kan: Resistenzgen für Kanamycin  
 sucDdel: deletiertes Allel des sucD-Gens aus *C. glutamicum*  
 SphI: Schnittstelle des Restriktionsenzym SphI  
 PstI: Schnittstelle des Restriktionsenzym PstI  
 XmaI: Schnittstelle des Restriktionsenzym XmaI  
 XbaI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym XbaI

## SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Degussa-Hüls AG  
 <120> Neue für die Gene sucC und sucD kodierende Nukleotidsequenzen  
 10 <130> 990171 BT  
 <140>  
 <141>  
 15 <160> 3  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 20 <211> 2410  
 <212> DNA  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 <220>  
 25 <221> CDS  
 <222> (142) .. (1347)  
 <223> sucC  
 <220>  
 30 <221> CDS  
 <222> (1372) .. (2253)  
 <223> sucD  
 <400> 1  
 35 gcaccacgga tccaattttg ttgcaatttg caaagtttac agtgtagac ttcacaatac 60  
 gatcatattg gtgagttgaa acacttactt ttacgggaag actttgttaa agacgcagaa 120  
 ggctctaagc atgggcccga a atg gaa ttg gca gtg gat ctt ttt gaa tac 171  
 Met Glu Leu Ala Val Asp Leu Phe Glu Tyr  
 40 1 5 10  
 caa gca cgg gac ctc ttt gaa acc cat ggt gtg cca gtg ttg aag gga 219  
 Gln Ala Arg Asp Leu Phe Glu Thr His Gly Val Pro Val Leu Lys Gly  
 15 20 25  
 45 att gtg gca tca aca cca gag gcg gcg agg aaa gcg gct gag gaa atc 267  
 Ile Val Ala Ser Thr Pro Glu Ala Ala Arg Lys Ala Ala Glu Glu Ile  
 30 35 40  
 50 ggc gga ctg acc gtc gtc aag gct cag gtc aag gtg ggc gga cgt ggc 315  
 Gly Gly Leu Thr Val Val Lys Ala Gln Val Lys Val Gly Gly Arg Gly  
 45 50 55  
 aag gcg ggt ggc gtc cgt gtg gca ccg acg tcg gct cag gct ttt gat 363  
 Lys Ala Gly Gly Val Arg Val Ala Pro Thr Ser Ala Gln Ala Phe Asp  
 55 60 65 70



EP 1 103 611 A1

	gct	gcg	gat	gcg	att	ctc	ggc	atg	gat	atc	aaa	gga	cac	act	gtt	aat	411
	Ala	Ala	Asp	Ala	Ile	Leu	Gly	Met	Asp	Ile	Lys	Gly	His	Thr	Val	Asn	
5	75					80					85					90	
	cag	gtg	atg	gtg	gcg	cag	ggc	gct	gac	att	gct	gag	gaa	tac	tat	ttc	459
	Gln	Val	Met	Val	Ala	Gln	Gly	Ala	Asp	Ile	Ala	Glu	Glu	Tyr	Tyr	Phe	
					95					100					105		
10	tcc	att	ttg	ttg	gat	cgc	gcg	aat	cgt	tcg	tat	ctg	gct	atg	tgc	tct	507
	Ser	Ile	Leu	Leu	Asp	Arg	Ala	Asn	Arg	Ser	Tyr	Leu	Ala	Met	Cys	Ser	
				110					115					120			
15	gtt	gaa	ggt	ggc	atg	gag	atc	gag	atc	ctg	gcg	aag	gaa	aag	cct	gaa	555
	Val	Glu	Gly	Gly	Met	Glu	Ile	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Pro	Glu	
			125					130					135				
20	gct	ttg	gca	aag	gtg	gaa	gtg	gat	ccc	ctc	act	ggt	att	gat	gag	gac	603
	Ala	Leu	Ala	Lys	Val	Glu	Val	Asp	Pro	Leu	Thr	Gly	Ile	Asp	Glu	Asp	
			140				145					150					
25	aaa	gcg	cgg	gag	att	gtc	act	gct	gct	ggc	ttt	gaa	act	gag	gtg	gca	651
	Lys	Ala	Arg	Glu	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Glu	Val	Ala	
	155					160					165					170	
30	gag	aaa	gtc	att	ccg	gtg	ctg	atc	aag	atc	tgg	cag	gtg	tat	tac	gaa	699
	Glu	Lys	Val	Ile	Pro	Val	Leu	Ile	Lys	Ile	Trp	Gln	Val	Tyr	Tyr	Glu	
					175					180					185		
35	gag	gaa	gca	aca	ctc	gtt	gag	gtg	aac	ccg	ttg	gtg	ctc	acg	gat	gac	747
	Glu	Glu	Ala	Thr	Leu	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Leu	Val	Leu	Thr	Asp	Asp	
				190					195					200			
40	ggc	gat	gtg	att	gcg	ctt	gat	ggc	aag	atc	acg	ctg	gat	gat	aac	gct	795
	Gly	Asp	Val	Ile	Ala	Leu	Asp	Gly	Lys	Ile	Thr	Leu	Asp	Asp	Asn	Ala	
			205					210					215				
45	gat	ttc	cgc	cat	gat	aac	cgt	ggt	gcg	ttg	gct	gaa	tct	gcc	ggt	ggc	843
	Asp	Phe	Arg	His	Asp	Asn	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Glu	Ser	Ala	Gly	Gly	
		220					225					230					
50	ttg	gac	att	ttg	gaa	ctg	aag	gcc	aag	aag	aat	gat	ctg	aac	tac	gtg	891
	Leu	Asp	Ile	Leu	Glu	Leu	Lys	Ala	Lys	Lys	Asn	Asp	Leu	Asn	Tyr	Val	
	235					240					245					250	
55	aaa	ctt	gat	ggc	tct	gtg	ggc	atc	att	ggc	aat	ggt	gca	ggt	ttg	gtg	939
	Lys	Leu	Asp	Gly	Ser	Val	Gly	Ile	Ile	Gly	Asn	Gly	Ala	Gly	Leu	Val	
					255					260					265		
60	atg	tcc	acg	ttg	gat	atc	gtg	gct	gca	gct	ggt	gaa	cgc	cat	ggt	ggg	987
	Met	Ser	Thr	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Glu	Arg	His	Gly	Gly	
				270				275						280			
65	cag	cgc	ccc	gcg	aac	ttc	cta	gac	att	ggt	ggc	gga	gca	tca	gct	gaa	1035
	Gln	Arg	Pro	Ala	Asn	Phe	Leu	Asp	Ile	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Ala	Glu	
				285				290					295				
70	tcg	atg	gct	gct	ggt	ctc	gat	gtg	atc	ctt	ggg	gat	agc	cag	gta	cgc	1083
	Ser	Met	Ala	Ala	Gly	Leu	Asp	Val	Ile	Leu	Gly	Asp	Ser	Gln	Val	Arg	
		300					305					310					

EP 1 103 611 A1

5	agt	gtg	ttt	gtg	aat	gtg	ttt	ggt	ggc	atc	acc	gcg	tgt	gat	gtg	gtg	1131
	Ser	Val	Phe	Val	Asn	Val	Phe	Gly	Gly	Ile	Thr	Ala	Cys	Asp	Val	Val	
	315					320					325					330	
	gca	aag	gga	atc	gtt	gga	gct	ttg	gat	gtg	ctc	ggc	gat	caa	gca	acg	1179
	Ala	Lys	Gly	Ile	Val	Gly	Ala	Leu	Asp	Val	Leu	Gly	Asp	Gln	Ala	Thr	
					335					340					345		
10	aag	cct	ctt	gtg	gtg	cgc	ctt	gat	ggc	aac	aac	gtg	gtg	gaa	ggc	aga	1227
	Lys	Pro	Leu	Val	Val	Arg	Leu	Asp	Gly	Asn	Asn	Val	Val	Glu	Gly	Arg	
					350				355					360			
15	cga	atc	ctc	gcg	gaa	tat	aac	cac	cct	ttg	gtc	acc	gtt	gtg	gag	ggt	1275
	Arg	Ile	Leu	Ala	Glu	Tyr	Asn	His	Pro	Leu	Val	Thr	Val	Val	Glu	Gly	
			365					370					375				
20	atg	gat	gca	gcg	gct	gat	cac	gct	gcc	cat	ttg	gcc	aat	ctt	gcc	cag	1323
	Met	Asp	Ala	Ala	Ala	Asp	His	Ala	Ala	His	Leu	Ala	Asn	Leu	Ala	Gln	
		380					385					390					
	cac	ggc	cag	ttc	gca	acc	gct	aat	tagttaagga gcacctgttt aatc atg								1374
	His	Gly	Gln	Phe	Ala	Thr	Ala	Asn							Met		
	395					400											
25	tct	att	ttt	ctc	aat	tca	gat	tcc	cgc	atc	atc	att	cag	ggc	att	acc	1422
	Ser	Ile	Phe	Leu	Asn	Ser	Asp	Ser	Arg	Ile	Ile	Ile	Gln	Gly	Ile	Thr	
		405					410					415					
30	ggt	tcg	gaa	ggt	tca	gag	cat	gcg	cgt	cga	att	tta	gcc	tct	ggt	gcg	1470
	Gly	Ser	Glu	Gly	Ser	Glu	His	Ala	Arg	Arg	Ile	Leu	Ala	Ser	Gly	Ala	
	420					425					430					435	
35	aag	ctc	gtg	ggt	ggc	acc	aac	ccc	cgc	aaa	gct	ggg	caa	acc	att	ttg	1518
	Lys	Leu	Val	Gly	Gly	Thr	Asn	Pro	Arg	Lys	Ala	Gly	Gln	Thr	Ile	Leu	
					440					445					450		
40	atc	aat	gac	act	gag	ttg	cct	gta	ttt	ggc	act	gtt	aag	gaa	gca	atg	1566
	Ile	Asn	Asp	Thr	Glu	Leu	Pro	Val	Phe	Gly	Thr	Val	Lys	Glu	Ala	Met	
				455					460					465			
	gag	gaa	acg	ggt	gcg	gat	gtc	acc	gta	att	ttc	gtt	cct	cca	gcc	ttt	1614
	Glu	Glu	Thr	Gly	Ala	Asp	Val	Thr	Val	Ile	Phe	Val	Pro	Pro	Ala	Phe	
			470					475					480				
45	gcc	aaa	gct	gcg	atc	att	gaa	gct	atc	gac	gct	cac	atc	cca	ctg	tgc	1662
	Ala	Lys	Ala	Ala	Ile	Ile	Glu	Ala	Ile	Asp	Ala	His	Ile	Pro	Leu	Cys	
		485					490					495					
50	gtg	att	att	act	gag	ggc	atc	cca	gtg	cgt	gac	gct	tct	gag	gcg	tgg	1710
	Val	Ile	Ile	Thr	Glu	Gly	Ile	Pro	Val	Arg	Asp	Ala	Ser	Glu	Ala	Trp	
	500					505					510					515	
55	gct	tat	gcc	aag	aag	gtg	gga	cac	acc	cgc	atc	att	ggc	cct	aac	tgc	1758
	Ala	Tyr	Ala	Lys	Lys	Val	Gly	His	Thr	Arg	Ile	Ile	Gly	Pro	Asn	Cys	
					520					525					530		

EP 1 103 611 A1

cca ggc att att act ccc ggc gaa tct ctt gcg gga att acg ccg gca 1806  
 Pro Gly Ile Ile Thr Pro Gly Glu Ser Leu Ala Gly Ile Thr Pro Ala  
 535 540 545

5

aac att gca ggt tcc ggc ccg atc ggg ttg atc tca aag tcg gga aca 1854  
 Asn Ile Ala Gly Ser Gly Pro Ile Gly Leu Ile Ser Lys Ser Gly Thr  
 550 555 560

10

ctg act tat cag atg atg tac gaa ctt tca gat att ggc att tct acg 1902  
 Leu Thr Tyr Gln Met Met Tyr Glu Leu Ser Asp Ile Gly Ile Ser Thr  
 565 570 575

15

gcg att ggt att ggc ggt gac cca atc atc ggt aca acc cat atc gac 1950  
 Ala Ile Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Ile Gly Thr Thr His Ile Asp  
 580 585 590 595

20

gct ctg gag gcc ttt gaa gct gat cct gag acc aag gca atc gtc atg 1998  
 Ala Leu Glu Ala Phe Glu Ala Asp Pro Glu Thr Lys Ala Ile Val Met  
 600 605 610

25

atc ggt gag atc ggt gga gat gca gag gaa cgc gct gct gac ttc att 2046  
 Ile Gly Glu Ile Gly Gly Asp Ala Glu Glu Arg Ala Ala Asp Phe Ile  
 615 620 625

30

tct aag cac gtg aca aaa cca gtt gtg ggt tac gtg gca ggc ttt acc 2094  
 Ser Lys His Val Thr Lys Pro Val Val Gly Tyr Val Ala Gly Phe Thr  
 630 635 640

35

gcc cct gaa gga aag acc atg ggg cat gct ggc gcc atc gtg aca ggt 2142  
 Ala Pro Glu Gly Lys Thr Met Gly His Ala Gly Ala Ile Val Thr Gly  
 645 650 655

40

tca gaa ggc act gcg cga gca aag aag cat gca ttg gag gcc gtg ggt 2190  
 Ser Glu Gly Thr Ala Arg Ala Lys Lys His Ala Leu Glu Ala Val Gly  
 660 665 670 675

45

ggt cgc gtg gga aca act ccg agt gaa acc gcg aag ctt atg cgt gag 2238  
 Val Arg Val Gly Thr Thr Pro Ser Glu Thr Ala Lys Leu Met Arg Glu  
 680 685 690

50

gta gtt gca gct ttg taactaacag gccacagatc ttagctttga ccagcggatt 2293  
 Val Val Ala Ala Leu  
 695

55

tgtggctaatt cgcccgggtct gtgtagagta ttcattctgtg cgcaggacag tgtgacaaac 2353

actgaatagt gcatggcttt aaggccctgt ggcgcagttg gtttagcgcgc cgccctg 2410

<210> 2  
 <211> 402  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2  
 Met Glu Leu Ala Val Asp Leu Phe Glu Tyr Gln Ala Arg Asp Leu Phe  
 1 5 10 15



EP 1 103 611 A1

	Glu	Thr	His	Gly	Val	Pro	Val	Leu	Lys	Gly	Ile	Val	Ala	Ser	Thr	Pro	
				20					25					30			
5	Glu	Ala	Ala	Arg	Lys	Ala	Ala	Glu	Glu	Ile	Gly	Gly	Leu	Thr	Val	Val	
			35					40					45				
	Lys	Ala	Gln	Val	Lys	Val	Gly	Gly	Arg	Gly	Lys	Ala	Gly	Gly	Val	Arg	
		50					55					60					
10	Val	Ala	Pro	Thr	Ser	Ala	Gln	Ala	Phe	Asp	Ala	Ala	Asp	Ala	Ile	Leu	
	65					70				75						80	
	Gly	Met	Asp	Ile	Lys	Gly	His	Thr	Val	Asn	Gln	Val	Met	Val	Ala	Gln	
				85						90					95		
15	Gly	Ala	Asp	Ile	Ala	Glu	Glu	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Ile	Leu	Leu	Asp	Arg	
			100					105						110			
	Ala	Asn	Arg	Ser	Tyr	Leu	Ala	Met	Cys	Ser	Val	Glu	Gly	Gly	Met	Glu	
20			115					120					125				
	Ile	Glu	Ile	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Pro	Glu	Ala	Leu	Ala	Lys	Val	Glu	
		130				135						140					
25	Val	Asp	Pro	Leu	Thr	Gly	Ile	Asp	Glu	Asp	Lys	Ala	Arg	Glu	Ile	Val	
	145					150					155					160	
	Thr	Ala	Ala	Gly	Phe	Glu	Thr	Glu	Val	Ala	Glu	Lys	Val	Ile	Pro	Val	
				165						170					175		
30	Leu	Ile	Lys	Ile	Trp	Gln	Val	Tyr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Ala	Thr	Leu	Val	
				180					185					190			
	Glu	Val	Asn	Pro	Leu	Val	Leu	Thr	Asp	Asp	Gly	Asp	Val	Ile	Ala	Leu	
			195					200					205				
35	Asp	Gly	Lys	Ile	Thr	Leu	Asp	Asp	Asn	Ala	Asp	Phe	Arg	His	Asp	Asn	
		210					215					220					
	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala	Glu	Ser	Ala	Gly	Gly	Leu	Asp	Ile	Leu	Glu	Leu	
	225					230					235					240	
40	Lys	Ala	Lys	Lys	Asn	Asp	Leu	Asn	Tyr	Val	Lys	Leu	Asp	Gly	Ser	Val	
				245						250					255		
	Gly	Ile	Ile	Gly	Asn	Gly	Ala	Gly	Leu	Val	Met	Ser	Thr	Leu	Asp	Ile	
45				260				265						270			
	Val	Ala	Ala	Ala	Gly	Glu	Arg	His	Gly	Gly	Gln	Arg	Pro	Ala	Asn	Phe	
				275				280					285				
50	Leu	Asp	Ile	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Ala	Glu	Ser	Met	Ala	Ala	Gly	Leu	
		290					295					300					
	Asp	Val	Ile	Leu	Gly	Asp	Ser	Gln	Val	Arg	Ser	Val	Phe	Val	Asn	Val	
	305					310					315					320	
55	Phe	Gly	Gly	Ile	Thr	Ala	Cys	Asp	Val	Val	Ala	Lys	Gly	Ile	Val	Gly	
				325						330					335		

Ala Leu Asp Val Leu Gly Asp Gln Ala Thr Lys Pro Leu Val Val Arg  
 340 345 350

Leu Asp Gly Asn Asn Val Val Glu Gly Arg Arg Ile Leu Ala Glu Tyr  
 355 360 365

Asn His Pro Leu Val Thr Val Val Glu Gly Met Asp Ala Ala Ala Asp  
 370 375 380

His Ala Ala His Leu Ala Asn Leu Ala Gln His Gly Gln Phe Ala Thr  
 385 390 395 400

Ala Asn

<210> 3

<211> 294

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 3

Met Ser Ile Phe Leu Asn Ser Asp Ser Arg Ile Ile Ile Gln Gly Ile  
 1 5 10 15

Thr Gly Ser Glu Gly Ser Glu His Ala Arg Arg Ile Leu Ala Ser Gly  
 20 25 30

Ala Lys Leu Val Gly Gly Thr Asn Pro Arg Lys Ala Gly Gln Thr Ile  
 35 40 45

Leu Ile Asn Asp Thr Glu Leu Pro Val Phe Gly Thr Val Lys Glu Ala  
 50 55 60

Met Glu Glu Thr Gly Ala Asp Val Thr Val Ile Phe Val Pro Pro Ala  
 65 70 75 80

Phe Ala Lys Ala Ala Ile Ile Glu Ala Ile Asp Ala His Ile Pro Leu  
 85 90 95

Cys Val Ile Ile Thr Glu Gly Ile Pro Val Arg Asp Ala Ser Glu Ala  
 100 105 110

Trp Ala Tyr Ala Lys Lys Val Gly His Thr Arg Ile Ile Gly Pro Asn  
 115 120 125

Cys Pro Gly Ile Ile Thr Pro Gly Glu Ser Leu Ala Gly Ile Thr Pro  
 130 135 140

Ala Asn Ile Ala Gly Ser Gly Pro Ile Gly Leu Ile Ser Lys Ser Gly  
 145 150 155 160

Thr Leu Thr Tyr Gln Met Met Tyr Glu Leu Ser Asp Ile Gly Ile Ser  
 165 170 175

Thr Ala Ile Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Ile Gly Thr Thr His Ile  
 180 185 190

Asp Ala Leu Glu Ala Phe Glu Ala Asp Pro Glu Thr Lys Ala Ile Val  
195 200 205

5 Met Ile Gly Glu Ile Gly Gly Asp Ala Glu Glu Arg Ala Ala Asp Phe  
210 215 220

Ile Ser Lys His Val Thr Lys Pro Val Val Gly Tyr Val Ala Gly Phe  
225 230 235 240

10 Thr Ala Pro Glu Gly Lys Thr Met Gly His Ala Gly Ala Ile Val Thr  
245 250 255

Gly Ser Glu Gly Thr Ala Arg Ala Lys Lys His Ala Leu Glu Ala Val  
15 260 265 270

Gly Val Arg Val Gly Thr Thr Pro Ser Glu Thr Ala Lys Leu Met Arg  
275 280 285

20 Glu Val Val Ala Ala Leu  
290

## 25 Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine für das sucC und/oder sucD-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

30 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3 enthält,

35 c) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

40 d) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 3,

e) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a), b), c) oder d), und

45 f) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenzen von a), b), c), d) oder e),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Succinyl-CoA Synthetase aufweist.

50 2. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.

3. Polynukleotide gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.

4. Polynukleotide gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID NO 1 dargestellt.

55 5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2 enthaltend

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID NO 1, oder



(ii) mindestens eine Sequenz, die den Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Hybridisierung unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.

7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.

8. Coryneforme Bakterien, in denen das sucC- und/oder sucD-Gen abgeschwächt wird.

9. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und/oder L-Glutamat, **dadurch gekennzeichnet**, daß man folgende Schritte durchführt,

a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Bakterien, in denen man zumindest das sucC- und/oder sucD-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet;

b) Anreicherung der L- Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

c) Isolieren der L-Aminosäure.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

12. Verfahren gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Expression des (der) Polynukleotids(e), das(die) für das sucC- bzw. sucD-Gen kodiert (kodieren), abschwächt, insbesondere ausschaltet.

13. Verfahren gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymproteins) herabsetzt, für das die Polynukleotide sucC und sucD kodieren.

14. Verfahren gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß man für die Herstellung von L-Aminosäuren, Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

14.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen,

14.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,

14.3 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende gap-Gen,

14.4 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi,

14.5 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk,

14.6 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen,

14.7 das für den L-Lysin-Export kodierende lysE-Gen,

14.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,

14.9 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1

verstärkt bzw. überexprimiert.

- 5 15. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryne-  
forme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der  
Gruppe

15.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck,

10

15.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi,

15.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB

15

15.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2

abschwächt.

20

16. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der Teile des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, mindestens  
aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz, trägt.

17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man  
Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.

25

18. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder  
Gene zu isolieren, die für Succinyl-CoA Synthase kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz des sucC und/  
oder sucD-Gens aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleo-  
tidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.

30

35

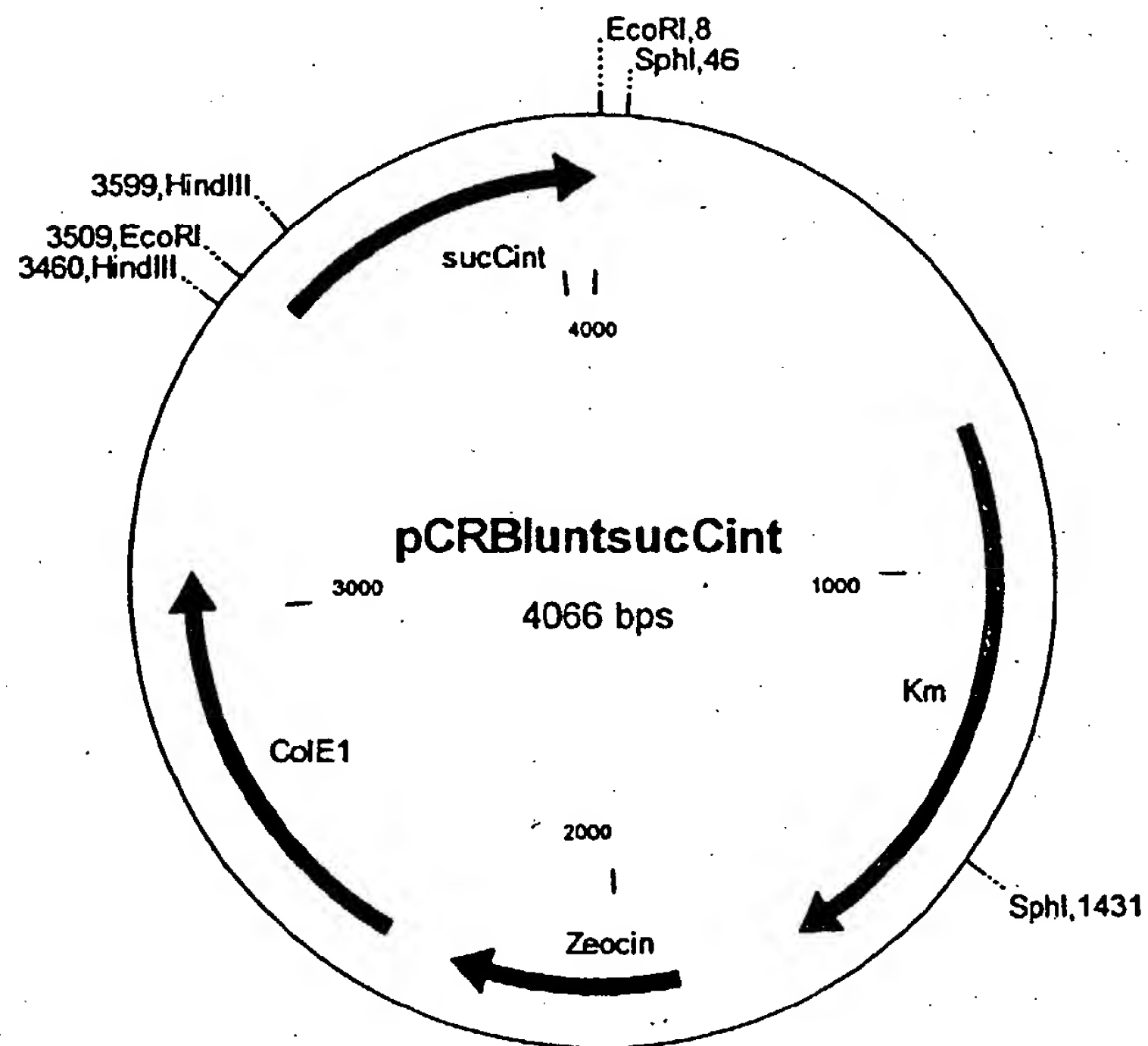
40

45

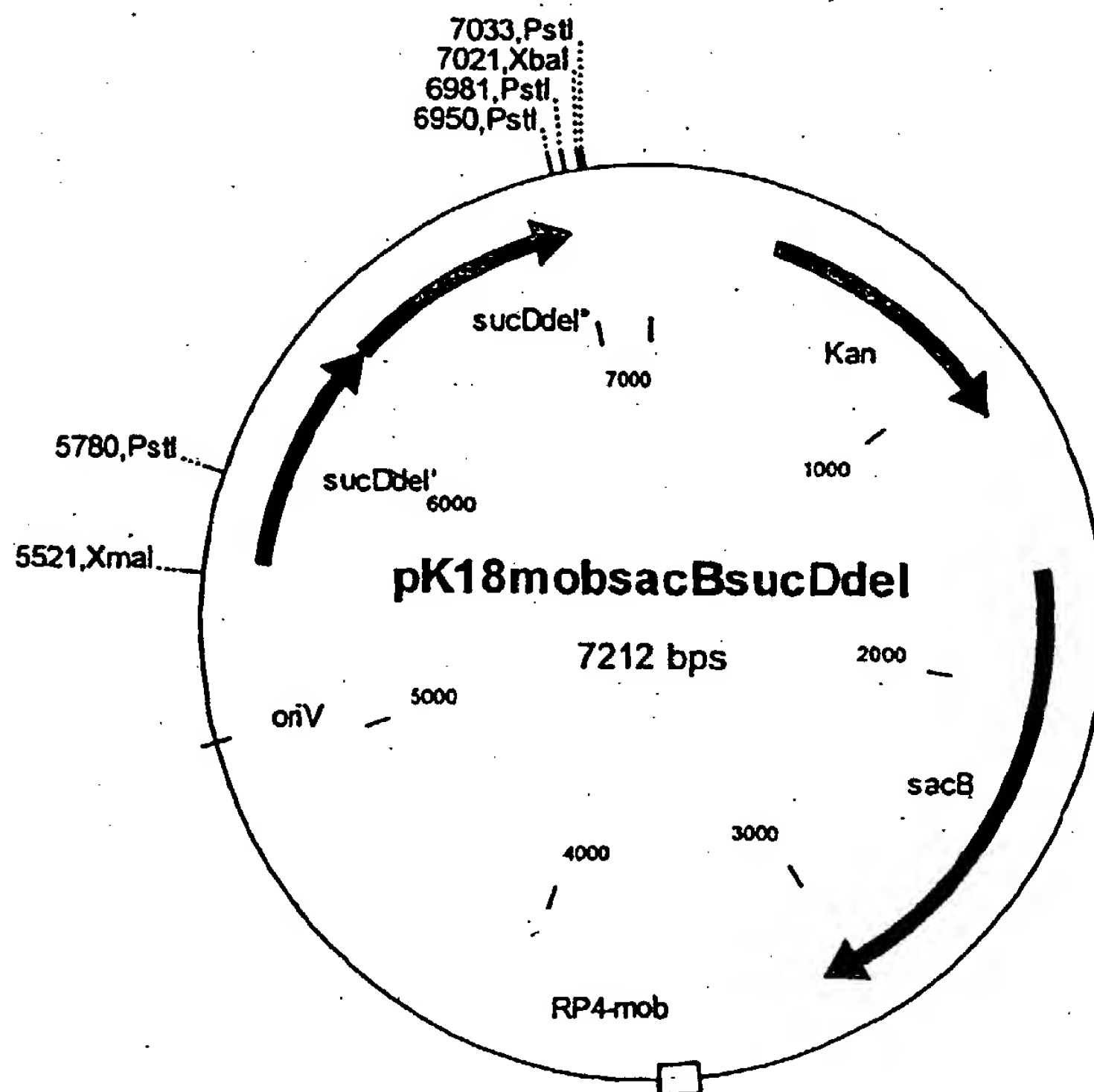
50

55

Figur 1: Plasmid pCRBluntsucCint



Figur 2: Plasmid pK18mobsacBsucDdel







Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 00 12 5527

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
X	<p>WALSHAW DAVID L ET AL: "Regulation of the TCA cycle and the general amino acid permease by overflow metabolism in Rhizobium leguminosarum." MICROBIOLOGY (READING), Bd. 143, Nr. 7, 1997, Seiten 2209-2221, XP002163026 ISSN: 1350-0872 * Zusammenfassung; Abbildungen 1-3; Tabellen 1,3 * * Seite 2216 *</p>	9,12,13	<p>C12N15/52 C12N9/00 C12P13/04 C12P13/14 //(C12P13/04, C12R1:15)</p>
X	<p>--- DATABASE EMBL [Online] accession: P71558, 1. November 1997 (1997-11-01) COLE S T ET AL: "SUCCINYL-COA SYNTHETASE ALPHA CHAIN (EC 6.2.1.5) (SCS-ALPHA)." XP002163027</p>	1-3,5,6,18	
E	<p>--- WO 01 00844 A (BASF AG) 4. Januar 2001 (2001-01-04) * SEQ ID NO:565; SEQ ID NO:566; SEQ ID NO:567; SEQ ID NO:568 * * Seite 46, Zeile 18 - Seite 48, Zeile 2; Ansprüche 1-38; Beispiele 1-13; Tabelle 1 * * Seite 54 - Seite 57 *</p>	1-13,16-18	<p>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)</p> <p>C12N C12P</p>
A	<p>--- DATABASE EMBL [Online] accession: P71559, 1. November 1997 (1997-11-01) COLE S T ET AL: "SUCCINYL-COA SYNTHETASE BETA CHAIN (EC 6.2.1.5) (SCS-BETA)." XP002163028 --- -/-</p>		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	
DEN HAAG		16. März 2001	
		Prüfer	
		Devijver, K	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
<p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p>			
<p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument --- A : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 (03.82) (P04C03)



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 00 12 5527

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
A	DATABASE EMBL [Online] accession: AL035500, 24. Februar 1999 (1999-02-24) HARRIS D ET AL: "Mycobacterium leprae cosmid L373." XP002163029 ---		
D,A	EP 0 197 335 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 15. Oktober 1986 (1986-10-15) -----		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>DEN HAAG</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>16. März 2001</b>	Prüfer <b>Devijver, K</b>
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPO FORM 1503 03 82 (P04C03)